

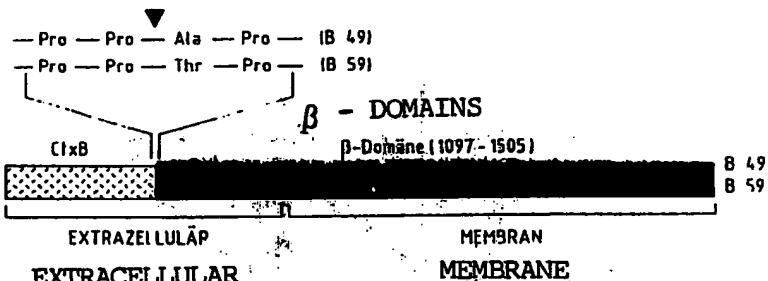


(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12N 15/62, 15/57, C07K 13/00 A61K 37/02	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/11520 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. August 1991 (08.08.91)
---	----	--

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/00192 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Februar 1991 (01.02.91) (30) Prioritätsdaten: P 40 03 149.7 3. Februar 1990 (03.02.90) DE P 40 15 921.3 17. Mai 1990 (17.05.90) DE P 40 15 922.1 17. Mai 1990 (17.05.90) DE P 40 39 415.8 10. Dezember 1990 (10.12.90) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstraße 10, D-3400 Göttingen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : MEYER, Thomas, F. [DE/DE]; Spemannstraße 30, D-7400 Tübingen (DE). POHLNER, Johannes [DE/DE]; Gartenstraße 44, D-7400 Tübingen (DE). SCHUMACHER, Günter [DE/DE]; Kapellenstraße 20, D-8131 Bernried (DE). DÖNY, Carola [DE/DE]; Waldschmidtstraße 15, D-8130 Starnberg (DE).	(74) Anwälte: Weickmann, H. usw. ; Möhlstrasse 22, D-8000 München 80 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KR, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent), SU, US. Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.
--	---

(54) Title: PROCESS FOR ENZYMATICAL CLEAVAGE OF RECOMBINANT PROTEINS BY MEANS OF IgA PROTEASES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ENZYMATISCHEN SPALTUNG REKOMBINANTER PROTEINE UNTER VERWENDUNG VON IgA-PROTEASEN



(57) Abstract

In order to effect enzymatical cleavage of fused proteins and to obtain desired parts of these fused proteins: (1) genetic engineering methods are used to modify a transitional region, in which two parts of the fused protein are linked together, so as to produce in this transitional region at least one IgA protease recognition site, with the amino acid sequence Y-Pro-X-Pro, where X may be any one amino acid and Y any one or more amino acids; (2) the fused protein resulting from step (1) is cleaved by applying the IgA-protease to the position of the recognition site marked IB; (3) one or more desired parts of the fused protein are obtained after cleavage.

(57) Zusammenfassung

Zur enzymatischen Spaltung von fusionierten Proteinen und Gewinnung von erwünschten Anteilen dieser fusionierten Proteine modifiziert man (1) mit gentechnischen Mitteln eine Übergangsregion, in der zwei Anteile des fusionierten Proteins miteinander verbunden sind, dass in dieser Übergangsregion mindestens eine IgA-Protease-Erkennungsstelle mit der Aminosäuresequenz Y-Pro-X-Pro entsteht, wobei X eine beliebige Aminosäure und Y eine oder mehrere beliebige Aminosäuren sein kann, (2) spaltet das aus Schritt (1) resultierende fusionierte Protein durch IgA-Protease an der mit IB bezeichneten Position der Erkennungsstelle und (3) gewinnt nach der Spaltung einen oder mehrere erwünschte Anteile des fusionierten Proteins.

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

**Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Malí
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinca	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Verfahren zur enzymatischen Spaltung rekombinanter Proteine  
unter Verwendung von IgA-Proteasen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur sequenzspezifischen Spaltung von biotechnologisch gewonnenen Proteinen unter Verwendung von IgA-Proteasen (auch als Igasen bezeichnet) und insbesondere ein Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine bzw. Peptide in Prokaryonten und die anschließende Entfernung einer N-terminalen Sequenz.

Die biotechnologische Darstellung von Proteinen wird vorzugsweise unter Verwendung von Mikroorganismen durchgeführt, die sich leicht züchten lassen und die Gewinnung des erzeugten Proteins auf einfache Weise gestatten. Geeignete Mikroorganismen hierfür sind z.B. das gramnegative Bakterium *Escherichia coli*, das grampositive Bakterium *Streptococcus carnosus* sowie die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Expression authentischer fremder Gene in solchen Mikroorganismen hat jedoch häufig Nachteile. In *E.coli* z.B. wird der translati onsbedingte aminotermrale Methioninrest natürlicher Proteine von Proteasen meist effizient abgespalten. Bei fremden Proteinen geschieht diese Abspaltung des ersten Methioninrestes jedoch meist nur partiell. Ein geeigneter Weg, solche Proteine mit einem definierten Aminoende herzustellen, ist es daher, diese zunächst in Form von fusionierten Proteinen zu bilden und im Anschluß mit einer sequenzspezifischen Protease definiert zu spalten.

Gegenüber authentischen Proteinen können solche fusionierten Proteine darüber hinaus den Vorzug besitzen, in der Zelle des Mikroorganismus zu aggregieren und dichte Präzipitationskörper ("Inclusion Bodies") zu bilden, die mit geringem Aufwand von anderen Zellteilen abtrennbar sind und somit die Isolierung und Reinigung des gewünschten Proteins erleichtern. Andererseits verleihen Trägerproteine, die mittels gentechnischer Verfahren zunächst an ein eigentlich erwünschtes Pro-

tein fusioniert werden, dem Fusionspartner besondere Stabilität gegen unspezifischen proteolytischen Abbau; das Problem des Abbaus von Polypeptiden, die als fremd erkannt werden, betrifft insbesondere die biotechnologische Darstellung kleiner Peptide. Wiederum andere Trägerproteine erlauben, die gewünschten Proteine in bestimmte Zellkompartimente zu steuern, aus welchen sie besonders leicht aufgereinigt werden können, wo sie besonders stabil sind und/oder wo sie für Testzwecke zugänglich sind. Schließlich können Trägerproteine auch spezielle Eigenschaften besitzen, die eine effiziente Aufreinigung, z.B. durch Affinitätschromatographie, erlauben. Für die meisten Anwendungszwecke sind fusionierte Proteine bevorzugt, die das Trägerprotein am Aminoende und das erwünschte Protein am Carboxylende tragen. Aber auch die umgekehrte Version oder die Verknüpfung des erwünschten Proteins mit zwei Fusionspartnern kann in bestimmten Fällen erwünscht sein. Weiterhin kann die Reiteration des erwünschten Proteins innerhalb einer Fusion vorteilhaft sein.

Für die Darstellung des erwünschten Proteins in freier Form aus einer derartigen Fusion ist die Spaltung der kovalent verbundenen Fusionspartner voneinander notwendig. Prinzipiell kann dies mit chemischen oder biochemischen (enzymatischen) Verfahren erreicht werden. Einschränkend wirkt sich jedoch dabei meist die begrenzte Spezifität der bisher zur Verfügung stehenden Verfahren aus; denn es ist wichtig, um das erwünschte Protein zu erhalten, daß eine derartige Spaltung in einer Spaltsequenz zwischen den Fusionspartnern, also der Übergangsregion, aber keinesfalls zusätzlich innerhalb des erwünschten Proteins selbst, erfolgt. Die Spaltung der Fusionspartner muß daher hochspezifisch erfolgen.

Bisher verwendete chemische Verfahren für die sequenzspezifische Trennung von fusionierten Proteinen sind beispielsweise die Spaltung durch Bromcyan an der Aminosäure Methionin innerhalb eines Proteins und die Spaltung zwischen den Amino-

säuren Asp.<sup>1</sup> Pro im sauren Milieu unter Verwendung von Ameisensäure. Diese Verfahren sind aber nur dann geeignet, wenn die spezifische Spaltstelle in dem erwünschten Protein, abgesehen von der Übergangsregion zum Fusionspartner, kein weiteres Mal vorhanden ist. Allgemein sind jedoch biochemische Spaltverfahren chemischen Verfahren vorzuziehen, weil erstere meist unter physiologischen oder zumindest chemisch milden Reaktionsbedingungen durchgeführt werden können, die das erwünschte Protein nicht schädigen.

Biochemische Verfahren zur Spaltung von fusionierten Proteinen basieren auf der Verwendung möglichst spezifischer Proteasen. Beispielsweise spaltet Trypsin die auf die Aminosäuren Arginin oder Lysin folgenden Peptidbindungen innerhalb von Proteinen. Eine Erhöhung der Spezifität kann durch vorangehende chemische Modifikation der Aminosäure Lys erzielt werden, wodurch sich die spezifische Erkennung auf die Aminosäure Arginin reduzieren lässt. Eine weitere biotechnologisch verwendete Protease ist Clostripain; dieses Enzym spaltet Peptidbindungen zwischen der Aminosäure Arginin und einer beliebigen darauffolgenden Aminosäure. Eine Übersicht über bisher eingesetzte enzymatische Verfahren zur Spaltung von fusionierten Proteinen wurde von F.A.O. Marston (In [D.M. Glover, E.]: DNA cloning III, IRL PRESS Oxford und Washington DC, 1987) verfaßt. Auch enzymatische Spaltverfahren werden dadurch eingeschränkt, daß die für die Spaltstelle spezifische(n) Aminosäure(n) zugleich auch in dem erwünschten Protein selbst vorkommen können. Zur biochemischen Spaltung von Proteinfusionen eignen sich daher besonders Enzyme, die zur Spaltung nicht nur eine Aminosäure, sondern eine Abfolge von Aminosäuren erkennen; denn die Wahrscheinlichkeit, daß eine bestimmte Aminosäureabfolge außer in der Spaltstelle zwischen den Fusionspartnern in dem erwünschten Protein selbst noch einmal vorkommt, ist umso geringer, je größer die Anzahl der für die Erkennung und Spaltung einer Spaltsequenz notwendigen Aminosäuren ist.

Proteasen, die ein bestimmtes Protein sehr spezifisch schneiden, sind bekannt. Die Mehrzahl solcher selektiver Proteasen (die z.B. im Komplement- und Blutgerinnungssystem des Menschen vorkommen) spaltet zwar an einer definierten Stelle des Substrats; bei Übertragung der entsprechenden Spaltregion in ein anderes Protein (z.B. ein fusioniertes Protein) sind derartige Proteasen im Regelfall jedoch nicht mehr in der Lage, zu spalten. Die Gründe hierfür sind vielfältig und liegen beispielsweise in der Erkennung einer bestimmten Sekundär- oder Tertiär-Struktur im Substrat durch die Protease oder in der Unzugänglichkeit der Spaltstelle in fusionierten Proteinen.

Die Liste sequenzspezifischer Proteasen, die für die Spaltung von fusionierten Proteinen bisher bedingt eingesetzt werden, wird zur Zeit von dem Faktor Xa angeführt. Diese Protease schneidet spezifisch die Spaltsequenz Ile-Glu-Gly-Arg-!..X, wobei !.. die Spaltstelle und X eine beliebige Aminosäure angibt. Es zeigt sich jedoch, daß auch diese Protease nicht generell zur Spaltung von fusionierten Proteinen, die eine entsprechende Spaltsequenz in ihrer Übergangsregion tragen, einsetzbar ist; häufig werden solche Substrate (d.h. fusionierte Proteine, die ein erwünschtes Protein kovalent gebunden an ein Trägerprotein enthalten) überhaupt nicht, nur zu einem geringen Ausmaß oder nur in löslicher Form gespalten.

Besonders bedeutsam ist eine effiziente Spaltung von fusionierten Proteinen bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen in prokaryontischen Organismen. Dort ist nämlich die Klonierung einer DNA-Sequenz erforderlich, die ein AUG als Initiationscodon vor dem Beginn der eigentlichen DNA-Sequenz enthält. Als Folge davon wird in Prokaryonten wie z.B. E. coli ein rekombinantes Protein exprimiert, das einen Methioninrest an Aminosäureposition -1 enthält.

In vielen Fällen ist jedoch eine Bereitstellung von in Position 1 methioninfreien rekombinanten Proteinen erforderlich. Die Gewinnung solcher Proteine aus Prokaryonten kann z.B. über eine Methionin-spezifische Peptidase erfolgen, die das N-terminale Methionin abspaltet. Dieses Verfahren ist jedoch sehr aufwendig, da die Abspaltung nur über Proteinsequenzierung überprüft werden kann. Außerdem ist eine Trennung von in Position -1 Methionin-haltigem und methioninfreiem Protein aufgrund des fast identischen Molekulargewichts sehr schwierig und kann damit nur unvollständig erreicht werden.

Die PCT-Anmeldung W084/02351 offenbart die Abspaltung N-terminaler Aminosäuren von einem Fusionsprotein. Dabei können mehrere Aminosäuren des Proteins vom N-Terminus her durch schrittweises Abspalten durch eine Exopeptidase, vorzugsweise Leucinpeptidase, bis zu einer Sequenz X-Pro entfernt werden. Die Sequenz X-Pro wird aus diesem Produkt entweder in zwei Schritten oder in einer 1-Schritt-Reaktion unter Verwendung von Postprolin-Dipeptidyl-Aminopeptidase (EC 3.4.14.) abgespalten. Dieses Verfahren besitzt jedoch den Nachteil, daß bedingt durch das schrittweise Abspalten der Aminosäuren vom N-Terminus des Proteins kein einheitliches Produkt, sondern immer ein Produktgemisch entstehen muß, das neben dem gewünschten Produkt sowohl unvollständig als auch zu weit abgebaute Proteine enthält.

Ein weiteres Verfahren zur enzymatischen Spaltung eines Fusionsproteins ist aus dem europäischen Patent Nr. 0 020 290 bekannt. Bei diesem Verfahren wird das Enzym Collagenase zum Abspalten des Fusionsanteils eines Proteins von einer bestimmten Erkennungssequenz verwendet. Danach können weitere Aminosäuren des Fusionsanteils anschließend durch weitere enzymatische Behandlung entfernt werden. Es wurde jedoch festgestellt, daß Collagenase und auch andere Endopeptidasen nur eine geringe Spezifität besitzen (siehe Biochim. Biophys. Acta 271 (1972), 133-144). Überdies sind die Collagenasen nur

bei Proteinen aktiv, die eine spezifische räumliche Struktur besitzen.

Auch die Verwendung des bereits erwähnten Faktor Xa zur Abspaltung eines N-terminalen Fusionsanteils von Proteinen ist bekannt. Doch auch dieses Verfahren zeigt neben den bereits erwähnten Problemen der Spaltungseffizienz weitere Nachteile, und zwar in der Art, daß möglicherweise auch interne Sequenzen des Proteins erkannt und gespalten werden. Darüberhinaus muß Faktor Xa aus Rinderserum isoliert werden, wodurch bei der Spaltung therapeutisch verwendeter Proteine anschließend eine aufwendige Reinigung und Analytik erforderlich ist, um eventuell vorhandene Pathogenitätsfaktoren bzw. Viren nachzuweisen.

Verschiedene pathogene Bakterienarten (z.B. der Gattung *Neisseria*, wie *Neisseria gonorrhoea* und *Neisseria meningitidis* oder der Gattung *Haemophilus* wie *Haemophilus influenzae* und *Haemophilus aegypticus*), die auf der menschlichen Schleimhaut wachsen, sekretieren untereinander in ihrer Sequenz nahe verwandte Proteasen, die spezifisch für menschliches IgA1 sind und daher zusammenfassend als IgA-Proteasen oder Igasen bezeichnet werden. Das Immunglobulin IgA1 ist eine wichtige Komponente der sekretorischen Immunantwort, die gegen Infektionen solcher pathogener Organismen schützen soll (Übersicht: Kornfeld und Plaut, Rev. Infect. Dis. 3 (1981), 521-534). Daneben spaltet die IgA-Protease auch ihr eigenes Vorfängerprotein durch Autoproteolyse. Die Bildung der IgA-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* MS11 im authentischen Bakterienstamm sowie in gramnegativen Wirtszellen wurde bereits ausführlich beschrieben (DE 36 22 221.6).

Die IgA-Protease spaltet folgende Erkennungssequenzen, wie z.B. bei Pohlner et al., (Nature 325 (1987), 458-462) beschrieben:

1. Pro-Ala-Pro-!-Ser-Pro
2. Pro-Pro-!-Ser-Pro
3. Pro-Pro-!-Ala-Pro
4. Pro-Pro-!-Thr-Pro

Dabei bedeutet das Symbol  $\cdot\cdot\cdot$  jeweils die Schnittstelle durch die IgA-Protease. Die Klonierung der IgA-Protease ist z.B. bei Pohlner et al., 1987, supra beschrieben.

Es war daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur biochemischen (enzymatischen) Spaltung von fusionierten Proteinen bereitzustellen, so daß gentechnologisch hergestellte fusionierte Proteine, bestehend aus beliebigen Fusionspartnern und einer spezifischen Spaltsequenz in der Übergangsregion, als Substrat für die Gewinnung erwünschter Proteine mit möglichst hoher Ausbeute und reproduzierbar eingesetzt werden können.

Diese Aufgabe wurde gentechnologisch gelöst durch die Erführung der Erkennungsstelle bzw. Spaltsequenz Pro-!-X-Pro, in die Übergangsregion von fusionierten Proteinen und durch die spezifische Spaltung dieser Spaltsequenz durch eine IgA-Protease an der mit  $\cdot\cdot\cdot$  bezeichneten Spaltstelle, wobei X vorzugsweise für die Aminosäuren Ser, Thr und Ala und besonders bevorzugt für Ser oder Thr steht, aber auch für andere Aminosäuren stehen kann.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur enzymatischen Spaltung von fusionierten Proteinen und Gewinnung von gewünschten Anteilen dieser fusionierten Proteine, welches dadurch gekennzeichnet ist,

- (1) mit gentechnischen Mitteln eine Übergangsregion, in der zwei Anteile des fusionierten Proteins miteinander verbunden sind, so modifiziert, daß in dieser Übergangsregion mindestens eine IgA-Protease-Erkennungsstelle mit der Aminosäuresequenz Y-Pro-!-X-Pro entsteht, wobei X

eine beliebige Aminosäure und Y eine oder mehrere beliebige Aminosäuren sein kann,

- (2) das aus Schritt (1) resultierende fusionierte Protein durch IgA-Protease an der mit '·' bezeichneten Position der Erkennungsstelle spaltet und
- (3) nach der Spaltung einen oder mehrere erwünschte Anteile des fusionierten Proteins gewinnt.

Unter den Begriff "IgA-Protease" gemäß vorliegender Erfindung fallen Proteasen, welche spezifisch IgA spalten, die beispielsweise in Rev. Infekt. Dis. 3 (1981) 521-534 beschrieben sind. Ebenso geeignet sind aber auch rekombinante IgA-Proteasen, wie sie beispielsweise in DE-A 36 22 221, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 7881-7885, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 2681-2685, Nature 325 (1987) 458-462 und EMBO Jour. 3 (1984) 1595-1601 beschrieben sind.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Modifizierung einer Übergangsregion von fusionierten Proteinen vorzugsweise derart, daß in die Übergangsregion eines fusionierten Proteins Nukleotidsequenzen eingebaut werden, die für eine IgA-Protease-Erkennungsstelle oder einen Teil davon kodieren, wobei diese Nukleotidsequenzen vor oder/und hinter einen oder mehrere, für erwünschte Anteile der Proteininfusion kodierenden DNA-Abschnitte eingebaut werden. Vorzugsweise verwendet man zu diesem Zweck Nukleotidabfolgen, die auf chemischem Weg synthetisiert worden sind.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere auch zur Spaltung von fusionierten Proteinen geeignet ist, die ursprünglich (d.h. vor der Modifikation der Übergangsregion) keine natürliche IgA-Protease-Erkennungsstelle aufweisen.

Die IgA-Protease-Erkennungsstelle für das erfindungsgemäße Verfahren weist die Aminosäure-Konsensussequenz Y-Pro-·-X-Pro

auf. Dabei kann X eine beliebige Aminosäure und Y eine oder mehrere beliebige Aminosäuren bedeuten. Vorzugsweise bedeutet X Serin, Threonin oder Alanin, besonders bevorzugt Serin oder Threonin. Y steht vorzugsweise für mehrere Aminosäuren, die mit der Sequenz Pro, Pro-Ala, Arg-Pro, Pro-Arg-Pro, Ala-Pro-Arg-Pro oder Pro-Ala-Pro-Arg-Pro enden.

Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet daher, daß eine IgA-Protease-Erkennungsstelle mit mindestens der Konsensus-Spaltsequenz Pro-!-X-Pro in die Übergangsregion eines beliebigen fusionierten Proteins, z.B. zwischen Trägerprotein und dem erwünschtem Protein eingeführt und zur Abspaltung und Gewinnung des erwünschten Proteins durch IgA-Protease benutzt werden kann. Dabei werden in der Spaltsequenz Pro-!-X-Pro vorzugsweise die Aminosäuren Ser, Ala oder Thr in der Position X eingesetzt. Zur weiteren Optimierung der Spaltung an der bezeichneten Stelle können der Spaltsequenz weitere spezielle Aminosäuren vorgeschaltet werden, insbesondere die Aminosäure Pro.

Besonders bevorzugt sind die Aminosäuresequenzen

- a) Pro-Ala-Pro-!-Ser-Pro,
- b) Pro-Pro-!-Ser-Pro,
- c) Pro-Arg-Pro-Pro-!-Ala-Pro
- d) Pro-Pro-!-Thr-Pro,
- e) Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-!-Thr-Pro oder
- f) Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-!-Thr-Pro.

Bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens auf die Spaltung von fusionierten Proteinen, in denen das erwünschte Protein einem Trägerprotein nachgeschaltet ist, entsteht nach Spaltung durch IgA-Protease ein Protein, dessen Aminoterminus durch die Sequenz X-Pro charakterisiert ist. Diese Sequenz kann als Teil des erwünschten Proteins von Vorteil, nachteilig oder aber belanglos sein. Von Vorteil ist diese Sequenz im allgemeinen dann, wenn das gentechnologisch dargestellte

erwünschte Protein auch in seiner natürlichen Form die entsprechenden beiden Aminosäuren X-Pro an seinem Aminoterminus enthält. Durch ein aminoterimnales X-Pro charakterisierte Proteine, die biotechnologisch wichtig sind, kommen in der Natur vor.

Das erfindungsgemäße Verfahren besitzt gegenüber allen anderen bekannten Verfahren zur Spaltung von Proteinfusionen die Vorzüge, daß es überraschenderweise universell auf fusionierte Proteine, die in ihrer Übergangsregion die angegebene Spaltsequenz tragen, anwendbar ist und daß es sowohl auf unlösliche, lösliche, membranassoziierte und zellgebundene Proteinfusionen angewendet werden kann. Als besonderen Vorteil bietet das Verfahren darüber hinaus die Möglichkeit, fusionierte Proteine bzw. Proteinfusionen in Form von Präzipitationskörpern zu spalten, derart wie sie in Mikroorganismen anfallen und von wo sie als solche leicht angereichert werden können. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß das verwendete Spaltenzym, Igase, mit geringem Aufwand aus Kulturmedien von nichtpathogenen Bakterien gewonnen werden kann.

Der Einbau der Spaltsequenz für Igase in die Übergangsregion einer Proteinfusion erfolgt durch gentechnische Mittel. So kann beispielsweise eine Abfolge von Nukleotiden bzw. eine Nukleotidsequenz, die für eine Spaltsequenz oder einen Teil davon kodiert, chemisch synthetisiert und zwischen die DNA-Abschnitte für ein Trägerprotein und ein erwünschtes Protein mittels bekannter gentechnischer Mittel eingebaut werden. Entsprechend kann auch eine natürliche Abfolge von Nukleotiden, die für eine geeignete Spaltsequenz oder einen Teil davon kodiert, eingebaut werden. Das für eine Proteinfusion kodierende Gen wird vorzugsweise unter die Kontrolle von geeigneten (vorzugsweise induzierbaren) Expressionssignalen gestellt, so daß eine den Anforderungen entsprechende Produktion von fusionierten Proteinen ermöglicht wird. Als Wirts-

zellen für die Produktion von Proteinfusionen können geeignete prokaryontische oder eukaryontische (pflanzliche wie tierische) Zellen verwendet werden; aber auch zellfreie Systeme sind möglich. Die dabei verwendeten Trägerproteine können beliebige Funktionen beinhalten, je nachdem welche Eigenschaften sie einer Proteinfusion verleihen sollen wie bestimmte Transportfunktionen, Funktionen, die die Aufreinigung der Proteinfusion oder deren Stabilität verbessern und vieles mehr. Bevorzugte Trägerproteine sind weiter unten erläutert.

Die dem erfindungsgemäßen Verfahren entsprechende Spaltung von Proteinfusionen erfolgt bevorzugt mit Igase, die von einem überproduzierenden nicht-pathogenen Bakterienstamm gebildet und durch Reinigung aus Kulturüberständen gewonnen wird (siehe z.B. DE-36 22 221).

Das erfindungsgemäße Verfahren kann für präparative wie auch für analytische Zwecke eingesetzt werden. Bei präparativem Einsatz dient das Verfahren der biotechnologischen Gewinnung wichtiger Proteine, die z.B. in der Medizin, in der Forschung, im Umweltschutz oder bei industriellen Prozessen bzw. Produkten Verwendung finden können. Bei analytischem Einsatz kann das Verfahren beispielsweise in Verbindung mit geeigneten Expressionssystemen zur Routineuntersuchung von Genfusionen dienen.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur enzymatischen Spaltung von fusionierten Proteinen und Gewinnung von erwünschten Anteilen dieser fusionierten Proteine ist dadurch gekennzeichnet, daß man

- (1) eine Zelle mit einer rekombinanten DNA oder einem rekombinanten Vektor transformiert, wobei die DNA bzw. der Vektor mindestens eine Kopie eines Gens enthält, das für ein fusioniertes Protein kodiert, das mindestens eine IgA-Protease-Erkennungsstelle in einer Übergangsregion enthält,

- (2) die transformierte Zelle in einem geeigneten Medium kultiviert,
- (3) das für das fusionierte Protein kodierende Gen in der transformierten Zelle zur Expression bringt,
- (4) das fusionierte Protein mit IgA-Protease spaltet und
- (5) einen oder mehrere erwünschte Anteile des fusionierten Proteins isoliert.

Dabei kann die Behandlung des fusionierten Proteins mit IgA-Protease im Medium (Kulturbrühe), nach dem Zellaufschluß oder/und nach teilweiser oder vollständiger Abtrennung von zellulären Proteinen erfolgen.

Zur Behandlung eines fusionierten Proteins, vorzugsweise eines prokaryontischen Expressionsprodukts, ist es weiterhin bevorzugt, die IgA-Protease in an sich dem Fachmann bekannter Weise, beispielsweise wie in EP-B 0 141 223 oder EP-B 0 141 224 beschrieben, zu immobilisieren.

Eine besonders bevorzugte Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Herstellung rekombinanter Proteine bzw. Peptide ohne N-terminalen Methioninrest aus fusionierten Proteinen bzw. Peptiden mit der Aminosäuresequenz Met-Y-Pro<sup>1</sup>·X-Pro-A, worin X für eine beliebige Aminosäure, vorzugsweise für Thr, Ala oder Ser steht, Y eine oder mehrere beliebige Aminosäuren bedeutet, die vorzugsweise, wenn X für Thr oder Ala steht, mit Pro endet oder, wenn X für Ser steht, mit der Sequenz Pro-Ala oder mit Pro-Pro endet, und A eine beliebige Aminosäuresequenz bedeutet. Dabei spaltet man das fusionierte Protein bzw. Peptid mit IgA-Protease und erhält ein Spaltprodukt mit der Aminosäuresequenz X-Pro-A. Beispielsweise beinhaltet dieses Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine aus prokaryontischen Zellen ohne N-terminalen Methioninrest die folgenden Schritte:

- (1) Transformieren einer prokaryontischen Zelle mit einem Gen, das für ein Protein bzw. Peptid mit der Aminosäuresequenz Met-Y-Pro-<sup>1</sup> · X-Pro-A kodiert, worin X, Y und A die obengenannten Bedeutungen besitzen,
- (2) Kultivieren der transformierten Zelle in einem geeigneten Medium und Exprimieren des transformierten Gens,
- (3) Spalten des Expressionsprodukts aus der transformierten Zelle mit der Aminosäuresequenz Met-Y-Pro-<sup>1</sup> · X-Pro-A durch IgA-Protease und
- (4) Isolieren des resultierenden Spaltprodukts mit der Aminosäuresequenz X-Pro-A ohne N-terminalen Methioninrest.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren lassen sich mit überraschend hoher Ausbeute und guter Spezifität in einem Schritt Proteine ohne N-terminalen Methioninrest gewinnen, welche die N-terminale Sequenz X-Pro besitzen, wobei X vorzugsweise Thr, Ala oder Ser bedeutet.

Der Trägeranteil Y des fusionierten Proteins bedeutet eine Aminosäuresequenz mit mindestens 1, vorzugsweise bis 100, besonders bevorzugt 1 bis 50 Aminosäuren, die mit einer von der IgA-Protease erkannten Spaltungssequenz endet. Steht X für die Aminosäure Serin, so endet Y vorzugsweise mit der Sequenz Pro-Ala oder Pro. Steht X für Thr oder Ala, so endet Y vorzugsweise mit Pro, mehr bevorzugt mit Arg-Pro, Pro-Arg-Pro oder Ala-Pro-Arg-Pro.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform steht Y für mindestens 5 Aminosäuren, die mit der Sequenz Pro-Ala-Pro-Arg-Pro enden. Für das erfindungsgemäße Verfahren sind jedoch an sich alle von der IgA-Protease erkannten Spaltstellen geeignet.

Der Trägeranteil Y kann daneben noch weitere an sich beliebige Aminosäuren, vorzugsweise bis 100, besonders bevorzugt bis 50 Aminosäuren enthalten. Vorzugsweise werden jedoch hierfür

solche Aminosäuresequenzen verwendet, die auf DNA-Ebene die Expression des Proteins Met-Y-Pro-<sup>1</sup>·X-Pro-A verbessern oder/und auf Aminosäureebene seine Aufreinigung aus der Zelle erleichtern.

Die Expression des Proteins Met-Y-Pro-<sup>1</sup>·X-Pro-A auf DNA-Ebene kann beispielsweise durch Fusion mit Fragmenten des  $\beta$ -Galactosidasegens verbessert werden, d.h. der Trägeranteil Y umfaßt einen Teil des  $\beta$ -Galactosidase-Proteins. Andere Möglichkeiten, die Expression des Proteins Met-Y-Pro-<sup>1</sup>·X-Pro-A zu erhöhen, sind dem Fachmann bekannt. Durch Fusion mit anderen Polypeptiden, insbesondere mit hochgeladenen (z.B. poly(Lys, Arg)) oder an bestimmte Substanzen mit hoher Affinität bindenden (z.B. Streptavidin) Polypeptiden bzw. Proteinen kann die Reinigung und Abtrennung des Expressionsprodukts erleichtert werden (siehe z.B. EP-A 0 089 626, EP-A 0 306 610).

Weiterhin ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein fusioniertes Protein, das mehrere Polypeptidanteile enthält und das eingebaut in mindestens einer Übergangsregion zwischen verschiedenen Polypeptidanteilen eine oder mehrere IgA-Protease-Erkennungsstellen mit der Aminosäuresequenz Pro-<sup>1</sup>·X-Pro aufweist, wobei X eine beliebige Aminosäure, vorzugsweise jedoch Ser, Thr oder Ala bedeutet. Besonders bevorzugt besitzt die Erkennungsstelle die Aminosäuresequenz (a) Pro-Ala-Pro-<sup>1</sup>·Ser-Pro, (b) Pro-Pro-<sup>1</sup>·Ser-Pro, (c) Pro-Arg-Pro-Pro-<sup>1</sup>·Ala-Pro, (d) Pro-Pro-<sup>1</sup>·Thr-Pro, (e) Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-<sup>1</sup>·Thr-Pro oder (f) Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-<sup>1</sup>·Thr-Pro, wobei <sup>1</sup> die Spaltstelle angibt.

Die vorliegende Erfindung beinhaltet insbesondere auch ein Protein bzw. Peptid mit der Aminosäuresequenz Met-Y-Pro-<sup>1</sup>·X-Pro-A, worin X vorzugsweise für Thr, Ala oder Ser steht, Y eine oder mehrere beliebige Aminosäuren bedeutet, und vorzugsweise, wenn X für Thr oder Ala steht, mit Pro endet oder, wenn X für Ser steht, mit der Sequenz Pro-Ala

oder Pro endet, und A eine beliebige Aminosäuresequenz bedeutet. Ein derartiges Protein bzw. Peptid wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren durch Transformation einer prokaryontischen Zelle mit einem rekombinanten Vektor exprimiert, der mindestens eine Kopie eines Gens enthält, das für ein derartiges Protein bzw. Peptid kodiert.

Die Sequenz A kann für eine beliebige Aminosäuresequenz stehen. Günstigerweise befindet sich jedoch innerhalb dieser Aminosäuresequenz keine weitere Spaltstelle für die IgA-Protease.

Weiterhin ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine rekombinante DNA, die für ein erfindungsgemäßes Protein bzw. Peptid kodiert und worin in mindestens einer Übergangsregion des fusionierten Proteins eine oder mehrere IgA-Protease-Erkennungsstellen bzw. Spaltsequenzen eingebaut sind.

Eine erfindungsgemäße rekombinante DNA ist auf eine dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannte Weise erhältlich. Üblicherweise wird hierzu ein Vektor, der eine für die Aminosäuresequenz A kodierende DNA-Sequenz enthält, mit Restriktionsendonuklease(n) im Bereich des 5'-Ende dieses Gens gespalten und mit Oligonukleotiden, welche die gewünschte Sequenz enthalten, religiert. Das Oligonukleotid muß dabei eine Sequenz enthalten, die für eine Spaltstelle der IgA-Protease oder einem Teil davon kodiert.

Weiterhin ein Gegenstand der Erfindung ist auch ein rekombinanter Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen rekombinanten DNA enthält. Die zur Proteinexpression in prokaryontischen Organismen geeigneten Basisvektoren sind dem Fachmann bekannt. Dieser Vektor ist günstigerweise ein solcher, der eine hohe Expression der erfindungsgemäßen rekombinanten DNA erlaubt. Vorzugsweise befindet sich die rekombinante DNA auf dem Vektor unter Kontrolle eines induzierbaren Expressionssignals (z.B. λ, tac, lac oder trp Promotor).

Der erfindungsgemäße Vektor kann sowohl extrachromosomal (z.B. Plasmid) als auch im Genom des Wirtsorganismus integriert (z.B. Bakteriophage Lambda) vorliegen. Vorzugsweise ist der erfindungsgemäße Vektor ein Plasmid. Vektoren, die sich jeweils für die Genexpression in einem bestimmten Wirtsorganismus eignen, sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie bekannt. Es kann sich um einen eukaryontischen, vorzugsweise aber um einen prokaryontischen Vektor handeln. Beispiele für zur Expression der erfindungsgemäßen DNA in Prokaryonten geeignete Vektoren sind etwa kommerziell erhältliche pUC- und pUR-Vektoren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Zelle, vorzugsweise eine prokaryontische Zelle, besonders bevorzugt eine E. coli Zelle, welche mit der erfindungsgemäßen rekombinanten DNA oder/und einem erfindungsgemäßen rekombinanten Vektor transformiert ist.

Beispiele für Proteine, welche die N-terminale Sequenz X-Pro besitzen, wobei X Thr, Ala oder Ser bedeutet, und die durch das erfindungsgemäße Verfahren in einem Schritt gewonnen werden können, sind etwa menschliches Erythropoietin, die  $\beta$ -Kette des menschlichen T-Zell-Rezeptors und insbesondere der menschliche Granulozyten-stimulierende Faktor (G-CSF).

G-CSF wird als Lymphokin von aktivierten Monozyten, Makrophagen sowie von einer Reihe anderer Zelllinien synthetisiert. Lymphokine sind an der Reifung von Zellen des Immun- bzw. Blutzellensystems beteiligt. Sie stimulieren die Reifung von Knochenmark-Stammzellen zu ausdifferenzierten Zellen. So induziert G-CSF z.B. die Bildung von Neutrophilen und Granulozyten.

Da G-CSF in der Lage ist, die Population von neutrophilen Zellen innerhalb kurzer Frist erheblich zu steigern, ergeben

sich für G-CSF beträchtliche therapeutische Anwendungsfelder. So könnte G-CSF z.B. nach Chemotherapie bei Krebs, bei der die Zellen des Immunsystems zerstört werden, eingesetzt werden. Weiterhin könnte man G-CSF bei Knochenmark-Transplantationen, bei schweren Brandwunden, bei durch Immunschwäche bedingten opportunistischen Infektionen und bei Leukämie verwenden.

G-CSF ist ein sekretorisches Proteinmolekül. Das primäre Translationsprodukt enthält daher eine N-terminale Signalsequenz, die bei der Sekretion abgespalten wird, so daß die Sequenz von reifem G-CSF mit den Aminosäuren Thr(+1)-Pro(+2) (Aminosäurepositionen +1 und +2) beginnt. Bei der Produktion von G-CSF in Prokaryonten wird dieses Signalpeptid nur schlecht oder gar nicht abgespalten, so daß zur Bereitstellung von G-CSF ohne Signalsequenz aus Prokaryonten ein AUG(Met) als Initiationscodon vor den Beginn der für reifen G-CSF kodierenden DNA-Sequenz, die auf Proteinebene mit Thr(+1)-Pro(+2) beginnt, kloniert werden muß. Als Folge davon wird in Prokaryonten, wie E.coli, ein G-CSF exprimiert, das ein Methionin an Aminosäureposition -1 enthält.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann ein in Aminosäureposition -1 methioninfreier G-CSF aus Prokaryonten, der mit den Aminosäuren Thr(+1)-Pro(+2) beginnt, auf einfache Weise hergestellt werden.

Dies geschieht, indem man ein Derivat eines G-CSF aus Prokaryonten gewinnt, welches in Position +1 und +2 der Aminosäure-Sequenz die Aminosäuren Thr(+1)-Pro(+2) und davor ab Position -1 der Aminosäuresequenz eine Aminosäuresequenz enthält, welche von IgA-Protease erkannt und von der Aminosäuresequenz des G-CSF, welche mit Thr(+1)-Pro(+2) beginnt, abgespalten werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Derivat in Position -1 und -2 je ein Pro, in Position -3 bis Position -1 die Aminosäuresequenz Arg-Pro-Pro, in Position -4 bis -1 der Aminosäuresequenz Pro-Arg-Pro-Pro oder in Position -5 bis Position -1 die Aminosäuresequenz Ala-Pro-Arg-Pro-Pro.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das Derivat von Position -6 bis Position -1 die Aminosäuresequenz

-6 -5 -4 -3 -2 -1  
Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro.

Unter G-CSF im Sinne der Erfindung wird natürlich vorkommendes G-CSF, dessen Sequenz beispielsweise in Science 232 (1986) 61 offenbart ist, sowie davon abgeleitete Derivate mit Granulozyten-stimulierender Wirksamkeit, deren Aminosäuresequenzen mit X(+1)-Pro(+2) beginnen, verstanden. X steht für Thr, Ser oder Ala, besonders bevorzugt für Thr.

Das erfindungsgemäße G-CSF-Derivat kann nach Expression in Prokaryonten durch Behandlung mit IgA-Protease zwischen Position +1 und -1 (zwischen Thr(+1) und Pro(-1)) gespalten werden. Damit wird durch einen einzigen Hydrolyseschritt ein in Position -1 methioninfreier G-CSF erhalten, dessen Aminosäuresequenz N-terminal mit den Aminosäuren Thr(+1)-Pro(+2) des natürlich vorkommenden G-CSF beginnt.

Bei der Expression von G-CSF in Prokaryonten werden schwerlösliche Aggregate (refractile bodies) gebildet, die inaktiv sind. Bevor das Protein z.B. für therapeutische Zwecke verwendet werden kann, muß es in seine aktive Form übergeführt werden. Bei den dem Fachmann geläufigen Verfahren (vgl. z.B. EP-A 0 219 874, EP-A 0 114 506, WO 84/03711) wird zunächst eine Solubilisierung durch Zugabe von Denaturierungsmitteln

durchgeführt, an die sich eine Renaturierung und gegebenenfalls weitere Reinigungsschritte anschließen. Die Behandlung des erfindungsgemäßen Proteins mit IgA-Protease kann vor Solubilisierung, nach Solubilisierung oder erst nach der Renaturierung erfolgen. Falls direkt nach Solubilisierung die Behandlung mit IgA-Protease durchgeführt werden soll, muß das Solubilisierungsmittel (z.B. Guanidin-Hydrochlorid oder Harnstoff) durch Dialyse vor Zugabe der IgA-Protease abgetrennt werden. Vorzugsweise wird die Behandlung mit IgA-Protease jedoch nach Renaturierung durchgeführt, da in diesem Fall die Ausbeuten an G-CSF besonders hoch sind.

Die Bedingungen für die Behandlung von G-CSF bzw. eines anderen zu spaltenden Proteins mit IgA-Proteasen sind an sich unkritisch. Es ist jedoch bevorzugt, dabei G-CSF (bzw. ein anderes Protein) zu IgA-Protease im Gewichtsverhältnis 1 : 1 bis 100 : 1 einzusetzen. Die Umsetzung erfolgt bevorzugt in gepufferter wässriger Lösung von pH 6,5 bis 8,5. Die Pufferkonzentration liegt vorzugsweise im Bereich zwischen 50 und 300 mmol/l, gegebenenfalls unter Zusatz von 20 - 100 mmol/l Natriumchlorid. Vorzugsweise erfolgt die Spaltung bei Raumtemperatur über 20 - 60 Minuten.

Nach Solubilisierung, Renaturierung und Spaltung mit IgA-Protease wird das so erhaltene Spaltprodukt vorzugsweise über Ionentauscher und Größenfraktionierung gereinigt. Die Verunreinigung des auf diese Weise hergestellten und in Position -1 methioninfreien G-CSF durch andere Proteine liegt unter 0,1 %, vorzugsweise unter  $10^{-3}$  %.

In Position -1 methioninfreies G-CSF kann durch Spaltung mit IgA-Protease also praktisch quantitativ von dem Methionin enthaltenen Fusionsprotein getrennt bzw. gereinigt werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann ein rekombinanter G-CSF aus Prokaryonten erhalten werden, der zu weniger als

0,1 %, vorzugsweise zu weniger als  $10^{-3}$  % durch anderere Proteine verunreinigt und quantitativ frei von einem G-CSF aus Prokaryonten ist, welcher in Position -1 ein Methionin enthält.

Ein Gegenstand der Erfindung ist auch ein Arzneimittel auf Basis eines durch das erfindungsgemäße Verfahren gewonnenen G-CSF aus Prokaryonten als Wirkstoff, gegebenenfalls zusammen mit üblichen pharmazeutischen Träger-, Füll- und Hilfstoffen. Eine solches Arzneimittel ist insbesondere für therapeutische Behandlungen, bei denen die Bildung von Granulozyten, insbesondere von Neutrophilen angeregt werden soll, geeignet.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate kommen vorzugsweise als Injektions- und Infusionslösungen zum Einsatz. Dies kann dadurch geschehen, daß eine bereits spritzfertige Lösung zur Verfügung gestellt wird, die die erfindungsgemäße Zusammensetzung besitzt. Es ist jedoch auch möglich, die pharmazeutischen Präparate in Form von Lyophilisaten zur Verfügung zu stellen. Diese werden dann mit an sich bekannten, zu Injektionszwecken geeigneten Mitteln oder Lösungen rekonstituiert. Als Injektionsmedium kommt vorzugsweise Wasser zur Anwendung, welches die bei Injektionslösungen üblichen Zusätze wie Stabilisierungsmittel, Lösungsvermittler, Puffer und isotonische Zusätze, beispielsweise eine physiologische NaCl-Konzentration, enthält. Derartige Zusätze sind beispielsweise Mannit, Tartrat- oder Citrat-Puffer, Ethanol, Komplexbildner wie z. B. Ethylendiamintetraessigsäure und deren nicht-toxischen Salze, sowie hochmolekulare Polymere, wie flüssiges Polyethylenoxid zur Viskositätsregulierung. Flüssige Trägerstoffe für Injektionslösungen müssen steril sein und werden vorzugsweise in Ampullen abgefüllt.

Schließlich beinhaltet die vorliegende Erfindung auch die Verwendung von in Position -1 methioninfreiem G-CSF aus Prokaryonten zur Herstellung von erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparaten.

Für den Fall, daß man bei Spaltung eines beliebigen fusionierten Proteins durch das erfindungsgemäße Verfahren als resultierendes Produkt ein Protein X-Pro-A erhält (wobei X eine beliebige Aminosäure und A eine beliebige Sequenz von Aminosäuren bedeutet), welches an seinem Aminoterminkus, jedoch ein unerwünschtes Dipeptid X-Pro trägt, dann kann dieses unerwünschte Dipeptid als Teil des erfindungsgemäßen Verfahrens durch die weitere Behandlung mit Dipeptidylaminopeptidasen (DPAP) abgetrennt werden. Dipeptidylaminopeptidasen wurden bisher bei einer Reihe von Mikroorganismen, Insekten, Amphibien und in verschiedenen menschlichen Geweben gefunden. Sie dienen z.B. zur schrittweisen Prozessierung von Vorläuferproteinen und besitzen zum Teil ausgeprägte Spezifität für den aminoterminalen Abbau des Dipeptids X-Pro (X-Pro-DPAPase; G. Kreil, Trends in Biochemical Sciences 15, 23-26, 1990). Durch die erfindungsgemäße Kombination von Igase und X-Pro-DPAP können daher erwünschte Proteine mit beliebigen aminoterminalen Aminosäuren hergestellt werden.

Mit der oben beschriebenen Kombination von Igase und X-Pro-DPAP gelingt es nun, auch Proteine mit einer anderen N-terminalen Aminosäuresequenz aus Prokaryonten in Position -1 methioninfrei herzustellen. Dazu wird zunächst ein Fusionsprotein gewonnen, welches die Aminosäuresequenz Met-Y-Pro-! · X-Pro-A besitzt, wobei nun in diesem Falle die Aminosäuresequenz A ohne die beiden N-terminalen Aminosäuren X-Pro der erwünschte Anteil des zu exprimierenden Proteins ist.

Das Expressionsprodukt der prokaryontischen Zelle mit der Aminosäuresequenz Met-Y-Pro-! · X-Pro-A wird zunächst mit IgA-Protease gespalten, so daß ein erstes Spaltprodukt mit der Aminosäuresequenz X-Pro-A entsteht.

Dieses Protein kann nun, wie oben beschrieben, mit einer Dipeptidylamino-Peptidase behandelt werden, welche spezifisch die Sequenz X-Pro erkennt und hinter Pro spaltet. Somit ent-

steht ein zweites Spaltprodukt mit der an sich beliebigen Aminosäuresequenz A. Das erfindungsgemäße Verfahren erweist sich somit als äußerst nützlich zur Herstellung verschiedenster Proteine ohne N-terminalen Methionin-Rest und ist nicht nur auf die Herstellung von Proteinen mit der N-terminalen Sequenz X-Pro beschränkt, wobei X vorzugsweise für Ser, Thr oder Ala steht.

Schließlich beinhaltet die Erfindung auch eine rekombinante DNA, die einen für eine (oben definierte) IgA-Protease-Erkennungsstelle kodierten Bereich enthält und zum Einbau in eine Übergangsstelle von fusionierten Proteinen geeignet ist. Vorzugsweise handelt es sich dabei um ein chemisch synthetisiertes DNA-Fragment, an dessen Enden sich günstigerweise eine oder mehrere geeignete Restriktionsschnittstellen befinden.

**Begriffsdefinitionen:**

Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet die biotechnologische Gewinnung erwünschter Proteine. Unter biotechnologisch versteht sich in diesem Zusammenhang, daß ein erwünschtes Protein oder ein Zwischenprodukt desselben unter Verwendung gentechnologischer Mittel und anderer biotechnologischer Verfahren (z.B. der Fermentation von Mikroorganismen) hervorgeht.

Ein erwünschtes Protein ist ein Zwischenprodukt oder ein Endprodukt, das z.B. im Bereich der Medizin, der Forschung, im Umweltschutz oder bei industriellen Prozessen bzw. Produkten Verwendung finden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet, daß ein erwünschtes Protein aus einem fusionierten Protein (auch als Proteinfusion bezeichnet) gebildet wird, wobei sich das fusionierte Protein bzw. die Proteinfusion aus mehreren kovalent mitein-

ander verbundenen Fusionspartnern zusammensetzt. Dabei stellt wenigstens einer der Fusionspartner ein erwünschtes Protein dar. Die Reihenfolge der Fusionspartner und deren Wiederholungsgrad in einem fusionierten Protein ist beliebig; vorzugsweise besteht sie jedoch aus einem aminoterminalen Trägerprotein und einem carboxyterminalen erwünschten Protein.

Ein Trägerprotein bzw. ein Trägeranteil dient dazu, dem erwünschten Protein in Form eines fusionierten Proteins besondere Eigenschaften zu verleihen. Derartige Eigenschaften können sich beispielsweise in einer erhöhten Stabilität der fusionierten Proteine äußern, die auf strukturellen Besonderheiten und damit einhergehend höherer Resistenz gegenüber zellulären Proteasen oder aber auf dem Transport der fusionierten Proteine in eine Umgebung mit geringer proteolytischer Aktivität beruhen. Darüber hinaus können im Trägerprotein Eigenschaften enthalten sein, die eine effiziente Reinigung der fusionierten Proteine erlauben. Dazu gehört z.B. die Bindung von bestimmten Liganden in Zusammenhang mit affinitätschromatographischen Methoden, die Ablagerung der fusionierten Proteine in mit geringem Aufwand abtrennbaren Präzipitationskörpern und der Transport der Proteine an leicht zugängliche Orte.

Die Bereiche innerhalb eines fusionierten Proteins, in denen die Komponenten (Trägerproteine und erwünschte Proteine) eines fusionierten Proteins miteinander in Verbindung treten, werden als Übergangsregionen bezeichnet.

Eine jede Übergangsregion kann durch eine oder mehrere Aminosäureabfolgen definiert sein. Die Aminosäureabfolgen (wie auch alle übrigen Folgen von Aminosäuren und Proteinen) werden von aminoterminal (links) in Richtung carboxyterminal (rechts) verstanden und dargestellt.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens enthalten all diejenigen Aminosäureabfolgen in Übergangsregionen, die durch IgA-Proteasen spaltbar sein sollen, die erfindungsgemäße Spaltsequenz bzw. Erkennungssequenz.

Diejenige Stelle zwischen zwei Aminosäuren einer Aminosäureabfolge, an der die Spaltung von fusionierten Proteinen bzw. Proteinfusionen erfolgt, wird als Spaltstelle bezeichnet.

Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet die enzymatische Spaltung von fusionierten Proteinen in den Übergangsregionen durch IgA-Protease. Unter IgA-Protease bzw. Igase werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens die IgA-Protease des Stammes *Neisseria gonorrhoeae* MS11 und alle anderen mit dieser Protease auf Nukleotidebene und in ihrem Bildungsprozeß verwandten Enzyme verstanden. Hierunter zählen insbesondere auch die IgA-Proteasen der Genera *Neisseria* und *Haemophilus*.

Der Mikroorganismus *E.coli* ED 8654 wurde unter der Nummer DSM 2102 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen, Griesebachstraße 8, 3400 Göttingen hinterlegt.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit der Zeichnung erläutert.

In der Zeichnung stellen dar:

Figur 1 zeigt schematisch die Proteinfusion zwischen dem Trägerprotein MS2-Polymerase (99 Aminosäuren) und der  $\beta$ -Domäne (Aminosäureposition 1195-1505) des IgA-Protease-Vorläufers aus *N. gonorrhoeae* MS11. Die Übergangsregion zwischen diesen beiden Anteilen besteht aus 12 Aminosäuren und enthält die Spaltsequenz -Pro-Pro- · Thr-Pro- für Igase. Für die Konstruktion der Spaltstelle wurden die vier Oligonukleotide (1) bis (4) zwischen die Restriktions-schnittstellen Eco RI und HindIII eingebaut. Die Herstellung des Polypeptids und die Spaltung mit

gereinigter Igase sind unter Beispiel 5 näher erläutert.

Figur 2 zeigt eine Proteininfusion bestehend aus dem Trägerprotein (99 Aminosäuren der MS2-Polymerase und 6 Plasmid-kodierte Aminosäuren) und 206 Aminosäuren vom CD8-Protein menschlicher T-Lymphozyten. In der Aminosäureabfolge des CD8-Proteins befindet sich eine natürliche Spaltsequenz, die durch Igase gespalten wird (siehe Beispiel 6).

Figur 3 zeigt die Proteininfusion B63\*, die mittels eines Expressions-Sekretionssystems von E.coli-Zellen produziert wurde. Sie besteht am Aminoende aus der Choleratoxin B Untereinheit (103 Aminosäuren), gefolgt von einer Verbindungsregion (11 Aminosäuren) mit der Igase Spaltstelle und am Carboxyende einem Teil (Aminosäureposition 1097-1160) der  $\beta$ -Domäne des IgA-Protease-Vorläufers. Die Igase Schnittstelle wurde mittels der beiden Oligonukleotide Tk006 und Tk007 zwischen die beiden Proteindomänen eingebaut.

Figur 4 zeigt schematisch die Proteininfusionen B49 und B59. Sie bestehen aus der Choleratoxin B Untereinheit und der  $\beta$ -Domäne des IgA-Protease-Vorläufers. Zwischen diesen Anteilen enthalten sie zwei unterschiedliche Übergangsregionen mit zwei verschiedenen Igase-Spaltsequenzen (-Pro-Pro-Ala-Pro- und -Pro-Pro-Thr-Pro-). Die Spaltsequenz wurde mit synthetischen Oligonukleotiden konstruiert (siehe Figur 3).

Beispiel 1

Konstruktion eines Plasmids zur Expression eines Methionin-freien G-CSF.

Die Konstruktion wird unter Verwendung des Expressionsvektors pPZ07-mgllac (WO 88/09373) durchgeführt. Dazu wird der Expressionsvektor pPZ07-mgllac mit Nco I gespalten und die überstehenden Enden mit Mung bean Nuklease entfernt. Anschließend wird der Vektor mit Bam H1 nachgespalten. Die IgA Erkennungssequenz wird auf DNA-Ebene über folgende Oligonukleotide bereitgestellt.

Oligonukleotid A:

5' AAT TCG GAG GAA AAA TTA ATG ACA CCA CTG CGA CCT CCT ACA  
CCA CTG GGC CCT G 3'

Oligonukleotid B

5' GAT CC AGG GCC CAG TGG TGT AGG AGG TCG CAG TGG TGT CAT TAA  
TTT TTC CTC CGA ATT 3'

Die beiden Oligonukleotide werden in äquimolaren Mengen zusammengegeben und in ca. einem 100-fachen Überschuß in den wie oben beschriebenen gespaltenen Vektor pPZ07-mgllac eingeführt. Nach Religierung werden auf übliche Weise kompetent gemachte Zellen von E.coli K12 transformiert. Nach bekannten Methoden wird die DNA aus den Zellen isoliert und mit Apa I und Bam HI gespalten. Ein ca. 520 bp langes G-CSF- Fragment wird unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen Apa I und BamHI aus der G-CSF Sequenz (Science 232 (1986), 61-65) isoliert. Dieses Fragment wird in den ebenfalls mit ApaI und BamHI gespaltenen Vektor einligiert.

Beispiel 2

Zusätzlich zu der IgA1-Erkennungssequenz kann das Fusionsprotein auch noch Peptide als Reinigungshilfe enthalten. Diese können aus der DNA die Streptavidin kodiert bestehen. Dazu wird ein Streptavidin Gen (WO 89/03422) in das richtige Translationsraster vor die IgA-Protease Erkennungssequenz kloniert.

Beispiel 3

Mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Plasmid werden E.coli K12-Zellen (ED 8654, DSM 2102) transformiert, auf den Antibiotikamarker (Ampicillin) selektioniert und das Plasmid durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Ein solcher Klon wird zur Anzucht und Expression von G-CSF verwendet. Die Zellen werden einem Vollmedium angezogen. Dieses Medium enthält pro Liter 16 g Bactotrypton (Difco), 10 g Hefe Extrakt (Difco) und 5 g Natriumchlorid. Die Zellen werden bis zu einer OD 546 von 2,0 wachsen gelassen und dann mit  $10^{-3}$  mol/l IPTG induziert. Nach weiteren 4 h werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, mit Lysozym/EDTA aufgeschlossen und das G-CSF als inclusion bodies (IB's, vgl. EP-A 0 219 874) isoliert.

Die Denaturierung bzw. Renaturierung der isolierten unlöslichen G-CSF-Fusionspartikel wird, wie in EP-A 0 219 874 beschrieben, durchgeführt. Die Denaturierung erfolgt durch Dialyse gegen 6 mol/l Guanidin-Hydrochlorid. Es kann hier bereits ein Aliquot entnommen werden und nach Dialyse gegen 5 mmol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7 für die Spaltung mit IgA-Protease (Bsp. 4) eingesetzt werden.

Alternativ erfolgt nach der Denaturierung in Guanidin-Hydrochlorid eine Dialyse gegen einen 5 mmol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7 der 1 mmol/l GSH und 3 mmol/l GSSG enthält. Nach Renaturierung erfolgt hier ebenfalls eine Dialyse gegen 5 mmol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7.

Beispiel 4

Spaltung des Fusionsprotein mit IgA1-Protease zur Herstellung eines nativen G-CSF ohne Methionin in Position-1

IgA1-Protease wird wie in EMBO Jour. 3 (1984), 1595-1601 beschrieben isoliert. Zu 10 µg nach Beispiel 3 renaturiertem bzw. denaturiertem G-CSF werden 2-5 µg IgA-Protease gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Über verschiedene Ionenaustauschersäulen wie Mono-Q oder Mono-S kann das methioninfreie G-CSF isoliert werden. Proteinsequenzierung des aminoterminalen Endes ergibt, daß das gereinigte G-CSF mit der korrekten Aminosäurefolge Thr(+1)-Pro(+2) beginnt.

Beispiel 5

Herstellung einer Proteininfusion und Spaltung unlöslicher Protein-Aggregate aus "Inclusion Bodies" an einer Igase spezifischen Schnittstelle.

Der prokaryontische Expressionsvektor pEX31C (K. Strelbel, Journal of Virology 57, 983-991, 1986) wurde in solcher Weise modifiziert, daß eine mit diesem System in E.coli-Zellen überproduzierte Proteininfusion durch Igase in das Trägerprotein und das erwünschte Protein aufgespalten werden konnte. Hierfür wurde aus synthetisch hergestellten Oligonukleotiden ein doppelsträngiges DNA-Fragment zusammengesetzt, welches für die Aminosäuresequenz Thr-Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-<sup>1</sup>.Thr-Pro kodiert. Dieses DNA-Fragment wurde mit gentechnologischen Methoden in die EcoRI-Schnittstelle des Expressionsvektors pEX31C eingesetzt. Darauf hinaus wurden direkt angrenzend in die HindIII-Schnittstelle zwei weitere synthetische DNA-Fragmente eingefügt, welche eine Reihe geeigneter Schnittstellen für Restriktions-Endonukleasen und Terminations-Signale für die an der Genexpression beteiligten bakteriellen Enzyme

enthielten. In das so entstandene Expressionsplasmid pEV37 wurde unter Benutzung der Schnittstellen für SmaI und HindIII ein DNA-Fragment eingesetzt, das für die  $\beta$ -Domäne des IgA-Protease-Vorläuferproteins aus *Neisseria gonorrhoeae* MS11 kodiert. Dadurch entstand ein hybrides Gen, bei dessen Ausprägung in *E.coli* ein Fusionsprotein gebildet wurde. Dieses enthielt am Aminoende als Trägerprotein 99 Aminosäuren der MS2-Polymerase, gefolgt von einer zentralen Übergangsregion von 12 Aminosäuren mit der Igase Spaltsequenz und der gewünschten  $\beta$ -Domäne am Carboxylende (siehe Figur 1). Mit gereinigter Igase ließ sich die  $\beta$ -Domäne vom Carboxylende der Proteininfusion an der Spaltstelle Pro<sup>1</sup> · Thr innerhalb der Übergangsregion abspalten.

Das Plasmid mit dem hybriden Gen wurde durch Transformation in *E.coli* Zellen eingebracht, die für die regulierbare Überproduktion der Proteininfusion den Regulationsfaktor CI<sup>857</sup> aus dem Bakteriophagen Lambda enthielten (E. Remaut, Gene 22, 103-113, 1983). Durch Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C wurde der CI<sup>857</sup>-Repressor inaktiviert und infolgedessen die Proteinproduktion in den rekombinanten *E.coli*-Zellen aktiviert. Hierzu wurden 50 ml einer 12 h bei 28°C gewachsenen *E.coli*-Kultur in 200 ml, zuvor auf 45°C vorgewärmtes Medium überführt und 2 Stunden bei 42°C weiter kultiviert. In diesem Schritt wurde die Proteininfusion im Zytoplasma der Bakterien in großen Mengen in Form von "Inclusion Bodies" angereichert. Die Bakterien wurden danach durch Zentrifugation geerntet, in 20 ml Lysepuffer (10 % Saccharose, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) suspendiert und nach Zugabe von 400  $\mu$ l Lysozymlösung (5 mg/ml) 30 min bei 22°C inkubiert. Das Detergenz Triton X-100 wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % zugegeben und die Lösung erneut 30 min inkubiert. Die bei der Lyse der Zellen freigesetzte DNA wurde durch Ultraschall-Behandlung zerkleinert, die unlöslichen Bestandteile, u.a. die in Präzipitationskörpern vorliegende Proteininfusion, wurden abzentrifugiert und anschließend in 5 ml H1NTE-Puffer (1 M Harnstoff,

50 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Sediment durch Beschallen in 5 ml PBS-Puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 140 mM NaCl) suspendiert und gewaschen. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, um Harnstoff-Rückstände vollständig zu entfernen. Schließlich wurde die unlösliche Fraktion, die das Fusionsprotein enthielt, durch Beschallen in 5 ml PBS-Puffer suspendiert.

Die Qualität und die Menge der suspendierten Proteininfusion wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12,5 %) und anschließender Färbung mit Coomassie-Blau bestimmt. Zur Spaltung wurde die Proteinsuspension in einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 1/100 (W/W) 3 h bei 37°C inkubiert. Die erfolgte Spaltung der ungereinigten und unlöslichen Proteininfusion wurde durch analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht, wobei sich ergab, daß ein Polypeptid in der für das  $\beta$ -Protein erwarteten Größe entstanden war. Dieses Protein wurde auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und einer automatisierten Sequenzanalyse unterworfen. Die Abfolge der endständigen Aminosäuren bestätigte seine Entstehung aus der Proteininfusion durch korrekte Spaltung an der vorhandenen Igase-Spaltstelle.

Bei der Spaltung wurden jedoch nur bis zu etwa 50. % der Gesamtmenge des eingesetzten Substrats umgesetzt. Durch Zugabe größerer Mengen Igase und durch längere Reaktionszeiten konnte keine Steigerung erzielt werden. Dies deutet darauf hin, daß im ungeschnittenen Anteil des Fusionsproteins die Schnittstelle für Igase nicht zugänglich ist. Hybridprotein und Spaltprodukte lagen auch nach der Inkubation mit Igase weiterhin in Form unlöslicher Aggregate vor und ließen sich demzufolge aus der Suspension durch Zentrifugation sedimentieren.

Spaltungs-Ausbeuten bis zu 90 % wurden erzielt, wenn anstatt der unsauberer "Inclusion Body"-Fraktion eine Proteininfusion eingesetzt wurde, die zuvor einem zusätzlichen Aufreinigungs-schritt unterworfen worden war. Dazu wurde das unlösliche Sediment nach dem Waschen in H1NTE-Puffer (s.o.) in 5 ml H7NTE-Puffer (7 M Harnstoff, 50 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen. Unlösliche Anteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die lösliche Fraktion gegen 5 l PBS-Puffer bei 4°C dialysiert. Bei der Entfernung des Harn-stoffes durch Dialyse präzipitierte das Fusionsprotein aus der Lösung in Form von unlöslichen Aggregaten. Die ausgefäl-lenen Aggregate wurden durch Ultraschall-Behandlung in eine feine Suspension überführt und wie oben beschrieben mit Igase gespalten und analysiert.

#### Beispiel 6

##### Spezifische Spaltung einer renaturierten, löslichen Protein-fusion mit Igase

Unter Verwendung des pEX-Expressionssystems wurde ein Hybrid-protein hergestellt (siehe Beispiel 1), welches aus der MS2-Polymerase und einem Teil des CD8-Proteins menschlicher cyto-toxischer T-Lymphozyten besteht (siehe Figur 2). Nach der Vorreinigung und dem Lösen des Proteins aus "Inclusion Bodies" in H7NTE-Puffer wurde als weiterer Reinigungsschritt ein präparatives 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel eingesetzt. Die Proteininfusion wurde als einzelne Bande nach dem Färben mit Coomassie-Blau aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend nach der Methode von Hunkapiller (Methods in Enzymology 91, 227-235, 1983) vom Gelmaterial getrennt. Die Elektroelution erfolgte dabei in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 7,9) dem 0,1 % SDS (Natriumlaurylsulfat) zugesetzt war. Das SDS wurde später durch Dialyse gegen 5 l TAE-Puffer bei 22°C entfernt. In einer weiteren Dialyse wurde das Protein in Aufbewahrungs-

puffer (20 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 140 mM NaCl, 50 % Glycerin) überführt. Das somit erhaltene lösliche Fusionsprotein wurde mit gereinigter Igase inkubiert (siehe Beispiel 5) und dabei vollständig an einer im CD8-Molekül enthaltenen Spaltstelle (-Pro-Pro-<sup>1</sup>-Thr-Pro-Ala-, siehe Figur 2) in zwei Polypeptid-Fragmente gespalten. Die Spezifität der Spaltung wurde durch Analyse der Aminosäureabfolge am Aminoende des kleineren Spaltproduktes überprüft. Dabei ergab sich wie erwartet die Sequenz Thr-Pro-Ala-Pro-Thr-Ile.

Beispiel 7

Spezifische Spaltung einer löslichen, aus Kulturüberständen gewonnenen Proteinfusion mit Igase.

Eine Proteinfusion bestehend aus der Choleratoxin B Untereinheit und einem Teil der b-Domäne (Pos. 1097-1160; J. Pohlner, Nature 325, 458-462, 1987) des IgA-Protease-Vorläufers aus N.gonorrhoeae MS11 wurde in löslicher Form aus Kulturüberständen rekombinanter E.coli-Zellen gewonnen. Um die beiden Proteinanteile voneinander trennen zu können, war in die Übergangsregion zwischen der Choleratoxin B-Untereinheit und der b-Domäne mit gentechnologischen Methoden eine künstliche Spaltsequenz für Igase (Pro-Pro-<sup>1</sup>-Thr-Pro-) eingesetzt worden. Hierfür waren die Oligonukleotide Tk006 und Tk007 zwischen die Restriktionsschnittstellen EcoRI und SacII in der Übergangsregion eingesetzt worden (siehe Figur 3). Das Fusionsprotein wurde aus 2 l Überstand einer 12 h bei 37°C gewachsenen Bakterienkultur durch Fällung mit Ammoniumsulfat angereichert und anschließend gegen 5 l PBS-Puffer dialysiert. Zur Spaltung wurde es in einer Konzentration von 50 µg/ml in PBS-Puffer in einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 1/50 (W/W) mit gereinigter Igase für 2 h bei 37°C inkubiert. Eine Immunblot-Analyse zeigte, daß das bei der vollständigen Spaltung auftretende größere Spaltfragment in seinem Moleku-

largewicht und in seiner Reaktion mit Antiserum der natürlichen Choleratoxin B-Untereinheit entsprach.

Beispiel 8

Spezifische Spaltung von Proteinfusionen auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien mittels Igase.

Ein Expressions-Sekretionssystem wurde benutzt, um die Proteinfusionen TKB49 und TKB 59 bestehend aus der Choleratoxin B Untereinheit und der Igα-Protease β-Domäne auf der Oberfläche von rekombinanten Salmonellen nach außen zu exponieren. Das für TKB49 kodierende hybride Gen enthielt in der Übergangsregion zwischen der Toxin- und der β-Domäne die Original-Spaltsequenz (c) (-Pro-Pro-!·Ala-Pro-) für die Igase. Dagegen wurde in das Gen für TKB59 ein künstliches DNA-Fragment, bestehend aus den Oligonukleotiden Tk006 und Tk007 zwischen die Restriktionsschnittstellen EcoRI und SacII eingesetzt, das für die Spaltsequenz (-Pro-Pro-!·Thr-Pro-) kodierte (siehe Figur 3). Wurden intakte Bakterien, die solche an ihrer Oberfläche verankerten Proteinfusionen trugen, mit gereinigter Igase inkubiert, dann konnte die spezifische Spaltung an den Igase-Schnittstellen beobachtet werden. In Immunblot-Analysen wurde gezeigt, daß die bei der Spaltung auftretenden kleinen Spaltfragmente in ihrer Größe und Reaktion mit Antiserum der natürlichen Choleratoxin B Untereinheit entsprachen.

Beispiel 9Aufreinigung aktiver Igase aus Kulturüberständen rekombinanter E.coli-Zellen

Rekombinante E.coli C600 Zellen, die das Plasmid pEX1070 (DE 36 22 221.6) mit einem modifizierten IgA-Proteasegen enthalten, sekretieren die aktive Igase in den Kulturüberstand. Durch Membranfiltration konnte das Enzym im Kulturüberstand angereichert und anschließend mit Ammoniumsulfat (0,42 g/ml) aus der Lösung ausgefällt werden. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in Biorex-Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 8,6 % Glyzerin) gelöst (1 ml Puffer pro 1 l Kulturüberstand), durch Dialyse gegen 2 l Puffer äquilibriert und anschließend einer Kationenaustausch-Chromatographie (Biorex70) unterworfen. Die gebundene IgA-Protease wurde in einem Schritt mit Elutions-Puffer (500 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 8,6 % Glyzerin) von der Säule eluiert und fraktioniert. IgA-Protease enthaltende Fraktionen wurden anschließend durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12,5 %) analysiert. An diesem Punkt der Aufreinigung ergab sich ein durchschnittlicher Reinheitsgrad von > 90 %. Für die Darstellung der Igase in reiner Form wurden eine Gelfiltration mit Sephadryl HR300 in Biorex-Puffer, gefolgt von einer weiteren Kationenaustausch-Chromatographie (s.o.), durchgeführt. Die Aktivität der Igase wurde durch Inkubation mit IgA 1-Antikörpern und Auftrennung der entstandenen Spaltprodukte im SDS-Polyacrylamidgel getestet.

Beispiel 10

Konstruktion eines Plasmides zur Expression eines methioninfreien Interleukin 3:

Die Konstruktion wird unter Verwendung des Expressionsvektors pPZ07-mglac (WO88/09373) durchgeführt. Dazu wird der Expressionsvektor pPZ07-mglac mit NCOI gespalten und die überstehenden Enden mit Mung bean Nuklease entfernt. Anschließend wird der Vektor mit Bam HI nachgespalten. Die optimierte aminotermrale Region des Fusionsproteins wird auf DNA-Ebene über folgende Oligonukleotide bereitgestellt:

Primer 1A:

5' AATTCGGAGGAAAAATTAAATGAAAGCCAAACGTTTAAAAACATGTCGACCATG  
GAG 3'

Primer 1B:

5' GGATCCTCCATGGTCGACATGTTTTAAACGTTGGCTTCATTAATTTTCC  
TCCGAATT 3'

Beide Oligonukleotide werden in equimolaren Mengen zusammengegeben und in ca. 100-fachem Überschuss in den wie oben beschriebenen gespaltenen Vektor pPZ07-mglac eingeführt. Nach Ligation werden auf übliche Weise kompetent gemachte Zellen von E.coli K12 transformiert. Nach bekannten Methoden wird die DNA aus den Zellen isoliert, mit SalI/Bam HI gespalten und mit einem DNA Fragment, das die kodierende Region von Interleukin 3 ohne Signalsequenz enthält (nachfolgend beschrieben), ligiert.

Die Bereitstellung der kodierenden Region von Interleukin 3 mit der Erkennungsregion für IgA Protease auf DNA-Ebene erfolgt über die bekannte Technik der PCR, indem eine PCR-Reak-

tion mit der c-DNA von Interleukin 3 als Template und mit nachstehend beschriebenen Primern durchgeführt wird:

Primer 2A:

5' AAGCTTGTGACCCACGTCCACCACTGACCCAGACAACGCC 3'

Primer 2B:

5' TTCGTTGGATCCCTAAAAGATCGCGAGGCTCAAAGT 3'

Das resultierende PCR Fragment wird mit den Enzymen Sal I und Bam HI nachgeschnitten und kann so direkt in die oben beschriebene Vektor-DNA eingefügt werden und kovalent mit Hilfe von Ligase verbunden werden.

Nach Transformation der DNA in einen geeigneten Wirt, z.B. E.coli K12 C600, kann IL 3 in E.coli in Form von Rb's synthetisiert und anschließend isoliert werden. Wie für G-CSF beschrieben wird eine De- und Renaturierung des Proteins durchgeführt und das renaturierte Protein mit IgA-Protease gespalten. Das so hergestellte met-freie IL 3 kann nach weiteren Reinigungsschritten zur Therapie eingesetzt werden.

Beispiel 11:

Konstruktion eines Plasmids zur Expression eines Methionin--freien Interleukin 2

Die Konstruktion kann unter Verwendung des Expressionsvektors pPZ07-mgllac (W088/09373) durchgeführt werden der nach Insertion der Primer 1A und 1B wie in Beispiel 10 beschrieben mit SalI/Bam HI gespalten wurde. Die Bereitstellung der kodierenden Region von Interleukin 2 mit der IgA-Protease Erkennungsregion auf DNA-Ebene erfolgt über die Methode der PCR, indem

eine PCR-Reaktion mit der c-DNA von Interleukin 2 als Template und den Primern 3A und 3B, die ebenfalls die Erkennungsregion für die IgA-Protease kodieren, durchgeführt wird.

**Primer 3A:**

5' AAGCTTGTGACCCACGTCCACCAGCACCTACTCAAGTTCTACAAAG 3'

**Primer 3B:**

5' TTCGTTGGATCCTCAAGTTAGTGTTGAGATGATGCTTT 3'

Das so erhaltene PCR-Fragment wird mit den Enzymen SalI und Bam HI nachgeschnitten und kann so direkt in die oben beschriebene Vektor DNA eingefügt werden. Das weitere Vorgehen erfolgt wie bei IL 3 beschrieben. In dem vorhergehenden Beispiel wurde beschrieben wie durch geeignete Verwendung der IgA-Protease Erkennungsschnittstelle und dem weiteren Verfahren Methionin-freie therapeutische Proteine hergestellt werden können, die mit der Aminosäuresequenz Ala Pro beginnen. Weitere Proteine, die analog den vorher beschriebenen Beispielen Methion-frei hergestellt werden können und zwar unter Verwendung von Oligonukleotiden die einmal die Erkennungsregion für die IgA-Protease sowie eine Region enthalten die analog dem 5' bzw. dem 3' Ende der publizierten Sequenz entspricht und damit über PCR-Amplifikation bereitgestellt werden können. Im folgenden sind weitere therapeutisch relevante Proteine aufgeführt, die in der reifen natürlicherweise vorkommenden Form mit Ala Pro beginnen und daher mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in analoger Weise hergestellt werden können:

Cathepsin L (EC 3.4.22.15), Mason, R.W. et al. Biochem. J. 240, 373-377, 1986.

Erythropoietin, Lai, P.H. et al. J. Biol. Chem. 261, 3116-3121, 1986.

Interleukin-1 beta, Zsebo, K.M. et al. Blood 71, 962-968, 1988.

Osteonectin, Fisher, L.W. et al. J. Biol. Chem. 262, 9702-9708, 1987.

Type IV collagenase, Collier I.E. et al, J. Biol. Chem. 263, 6579-6587, 1988.

Weiterhin können auf diese Weise Proteine hergestellt werden, die in der reifen Form mit der Aminosäuresequenz Ser, Pro beginnen. Als Beispiel sind hier zu nennen:

Alpha-1 antitrypsin, Hill, R.E. et al., Nature 311 , 175-177, 1984.

Atrial natriuretic factor, Kambayashi, Y. et al., FEBS Lett. 259, 341-345, 1990.

Weitere Beispiele für Proteine die in ihrer reifen Form mit Thr Pro beginnen und die therapeutische relevant sein können sind zum Beispiel:

Complement factor B, Campell, R. D. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 80, 4464-4468, 1983.

Apolipoprotein A, Eaton, D.L. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 84, 3224-3228, 1987.

Nachstehend ist die Hinterlegungsangabe für den erwähnten Mikroorganismus aufgeführt.

Boehringer Mannheim GmbH

Postfach 120

8132 Tutzing

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt aufgrund der Regel 7.1 von der  
unter angegebenen INTERNATIONALEN HINTER-  
LEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS

Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezeichnen: BMTU 2602	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGS- STELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 2102
---	--

II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG

Mit dem unter I bezeichneten Mikroorganismus wurde

eine wissenschaftliche Beschreibung  
 eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung

eingereicht

(Zutreffendes ankreuzen.)

III. EINGANG UND ANNAHME

Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 01.10.1981 (Datum der Ersthinterlegung)<sup>1</sup> eingegangen ist.

IV. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE

Name: DEUTSCHE SAMMLUNG  
VON MIKROORGANISMEN  
Anschrift: Grisebachstrasse 8  
D-3400 Göttingen

Unterschrift (en) der zur Vertretung  
der internationales Hinterlegungsstelle  
befugten Person (en) oder des (der) von ihr  
ermächtigten Bediensteten:

Datum: 02.06.1982



<sup>1</sup> Im Fall der Regel 6.4 Buchstabe d ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist; wird eine außerhalb des Budapest Vertrags vorgenommene Hinterlegung nach dem Erwerb des Status einer internationalen Hinterlegungsstelle in eine Hinterlegung aufgrund des Budapest Vertrags umgewandelt, so ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Mikroorganismus bei der internationalen Hinterlegungsstelle eingegangen ist.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zur enzymatischen Spaltung von fusionierten Proteinen und Gewinnung von erwünschten Anteilen dieser fusionierten Proteine,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man
  - (1) mit gentechnischen Mitteln eine Übergangsregion, in der zwei Anteile des fusionierten Proteins miteinander verbunden sind, so modifiziert, daß in dieser Übergangsregion mindestens eine IgA-Protease-Erkennungsstelle mit der Aminosäuresequenz Y-Pro-!-X-Pro entsteht, wobei X eine beliebige Aminosäure und Y eine oder mehrere beliebige Aminosäuren sein kann,
  - (2) das aus Schritt (1) resultierende fusionierte Protein durch IgA-Protease an der mit '!' bezeichneten Position der Erkennungsstelle spaltet und
  - (3) nach der Spaltung einen oder mehrere erwünschte Anteile des fusionierten Proteins gewinnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Modifizierung der Übergangsregion eines fusionierten Proteins durch Einbau von Nukleotidsequenzen bewirkt, die für eine IgA-Protease-Erkennungsstelle oder einen Teil davon kodieren, wobei die Nukleotidsequenzen vor oder/und hinter einen oder mehrere DNA-Abschnitte eingebaut werden, die für erwünschte Anteile des fusionierten Proteins kodieren.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man ein fusioniertes Protein modifiziert, das ursprünglich keine natürliche IgA-Erkennungsstelle aufweist.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Übergangsregion eines fusionierten Proteins modifiziert, welches neben einem erwünschten Anteil noch einen oder mehrere Trägeranteile enthält.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägeranteil des fusionierten Proteins einen Teil der  $\beta$ -Galactosidase enthält.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägeranteil des fusionierten Proteins mehrere geladene Aminosäuren oder/und ein an spezifische Substanzen mit hoher Affinität bindendes Protein oder Polypeptid enthält.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß X Ser, Thr oder Ala bedeutet.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß X Ser oder Thr bedeutet.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Y mit der Sequenz Pro, Pro-Ala, Arg-Pro, Pro-Arg-Pro, Ala-Pro-Arg-Pro oder Pro-Ala-Pro-Arg-Pro endet.

10. Verfahren nach Anspruch 9,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß die IgA-Protease-Erkennungsstelle die Aminosäurese-  
quenz

- a) Pro-Ala-Pro-<sup>1</sup>·Ser-Pro,
- b) Pro-Pro-<sup>1</sup>·Ser-Pro,
- c) Pro-Arg-Pro-Pro-<sup>1</sup>·Ala-Pro
- d) Pro-Pro-<sup>1</sup>·Thr-Pro,
- e) Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-<sup>1</sup>·Thr-Pro oder
- f) Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-<sup>1</sup>·Thr-Pro

besitzt.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß man

- (1) eine Zelle mit einer rekombinanten DNA oder/und einem rekombinanten Vektor transformiert, wobei die DNA bzw. der Vektor mindestens eine Kopie eines Gens enthält, das für ein fusioniertes Protein kodiert, das mindestens eine IgA-Protease-Erkennungsstelle in einer Übergangsregion enthält,
- (2) die transformierte Zelle in einem geeigneten Medium kultiviert,
- (3) das für das fusionierte Protein kodierende Gen in der transformierten Zelle zur Expression bringt,
- (4) das fusionierte Protein mit IgA-Protease spaltet und
- (5) einen oder mehrere erwünschte Anteile des fusionierten Proteins isoliert.

12. Verfahren nach Anspruch 11,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß man das fusionierte Protein im Medium nach dem Zellaufschluß oder/und nach Abtrennung von zellulären Proteinen mit einer IgA-Protease spaltet.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, durch gekennzeichnet, daß man zur Spaltung des fusionierten Proteins eine IgA-Protease verwendet, die aus pathogenen Bakterienarten der Gattung *Neisseria*, insbesondere *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* oder der Gattung *Haemophilus*, insbesondere *Haemophilus influenzae* und *Haemophilus aegyptius* oder von einer derartigen IgA-Protease durch Modifikationen abgeleiteten Protein stammt.
14. Verfahren nach Anspruch 13, durch gekennzeichnet, daß man zur Spaltung des fusionierten Proteins eine IgA-Protease verwendet, die aus einem überproduzierenden, nicht-pathogenen Bakterienstamm gewonnen wird.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, durch gekennzeichnet, daß man zur Spaltung des fusionierten Proteins die IgA-Protease in immobilisierter Form verwendet.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, durch gekennzeichnet, daß man ein fusioniertes Protein spaltet, das in löslicher, unlöslicher, membranassozierter oder zellgebundener Form vorliegt.
17. Verfahren nach Anspruch 16, durch gekennzeichnet, daß man ein fusioniertes Protein spaltet, das als unlöslicher Präzipitationskörper vorliegt.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, durch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von rekombinanten Proteinen aus prokaryontischen Zellen ohne N-terminalen Methioninrest ein fusioniertes Protein mit der Sequenz Met-Y-Pro-<sup>1</sup>-X-Pro-A, worin X eine beliebige Aminosäure und Y eine oder mehrere beliebige Aminosäuren und A eine beliebige Aminosäuresequenz bedeutet, mit einer IgA-Protease spaltet, wobei als Spaltprodukt ein Protein bzw. Peptid mit der Aminosäuresequenz X-Pro-A erhalten wird.
19. Verfahren nach Anspruch 18, durch gekennzeichnet, daß der erwünschte Anteil des fusionierten Proteins mit der Aminosäuresequenz X-Pro beginnt.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, durch gekennzeichnet, daß X-Pro-A für menschlichen Granulozyten-Colonie stimulierenden Faktor (G-CSF) oder ein Derivat davon steht.
21. Verfahren nach Anspruch 18, durch gekennzeichnet, daß man nach Spaltung mit der IgA-Protease den erwünschten Anteil des fusionierten Proteins in einem weiteren Schritt mit einer Dipeptidyl-Aminopeptidase behandelt und auf diese Weise die N-terminale Sequenz X-Pro abspaltet.
22. Verfahren nach Anspruch 21, durch gekennzeichnet, daß man zur Abspaltung der N-terminalen Sequenz X-Pro eine X-Pro-Dipeptidyl-Aminopeptidase verwendet.

23. Fusioniertes Protein, das mehrere Polypeptidanteile enthält,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß es in mindestens einer Übergangsregion zwischen den jeweiligen Polypeptidanteilen eine oder mehrere IgA-Protease-Erkennungsstellen mit der Aminosäuresequenz Y-Pro-<sup>1</sup>-X-Pro aufweist, wobei X eine beliebige Aminosäure, vorzugsweise Ser, Thr oder Ala bedeutet und Y eine oder mehrere beliebige Aminosäuren sein kann.
24. Fusioniertes Protein nach Anspruch 23,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß es die Aminosäuresequenz Met-Y-Pro-<sup>1</sup>-X-Pro-A besitzt, worin X und Y die obige Bedeutung besitzen und A eine beliebige Aminosäuresequenz bedeutet.
25. Fusioniertes Protein nach Anspruch 23 oder 24,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß Y die Sequenz Pro, Pro-Ala, Pro-Arg-Pro, Ala-Pro-Arg-Pro oder Pro-Ala-Pro-Arg-Pro an ihrem Ende enthält.
26. Fusioniertes Protein nach einem der Ansprüche 23 bis 25,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß die Aminosäuresequenz X-Pro-A für einen Granulozyten-Colonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) oder ein Derivat davon steht.
27. Rekombinanter G-CSF nach Anspruch 26,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß er im wesentlichen quantitativ frei von einem G-CSF mit N-terminalem Methioninrest ist.
28. Rekombinanter G-CSF nach Anspruch 26 oder 27,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß er zu weniger als 0,1 % durch andere Proteine verunreinigt ist.

29. Rekombinanter G-CSF nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß er zu weniger als  $10^{-3}$  % durch andere Proteine unreinigt und quantitativ frei von einem G-CSF ist, welcher einen N-terminalen Methioninrest trägt.
30. Arzneimittel, enthaltend einen G-CSF oder G-CSF-Derivat nach einem der Ansprüche 26 bis 29 als Wirkstoff und gegebenenfalls übliche pharmazeutische Zusatz-, Hilfs- oder/und Trägermittel.
31. Verwendung eines G-CSF-Derivats nach einem der Ansprüche 26 bis 29 zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten gegebenenfalls unter Zusatz von üblichen pharmazeutischen Zusatz-, Hilfs-, Füll- oder/und Trägerstoffen.
32. Rekombinante DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein fusioniertes Protein nach einem der Ansprüche 23 bis 29 kodiert.
33. Rekombinanter Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine oder mehrere Kopien einer rekombinanten DNA nach Anspruch 32 enthält.
34. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß sich die rekombinante DNA unter Kontrolle eines induzierbaren Expressionssignals befindet.
35. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, daß er ein prokaryontischer Vektor ist.

36. Rekombinanter Vektor nach einem der Ansprüche 32 bis 34, durch gekennzeichnet, daß er ein Plasmid ist.
37. Zelle, durch gekennzeichnet, daß sie mit einer DNA nach Anspruch 32 oder einem Vektor nach Anspruch 33 bis 36 transformiert ist.
38. Zelle nach Anspruch 37, durch gekennzeichnet, daß sie eine prokaryontische Zelle ist.

Fig. 1

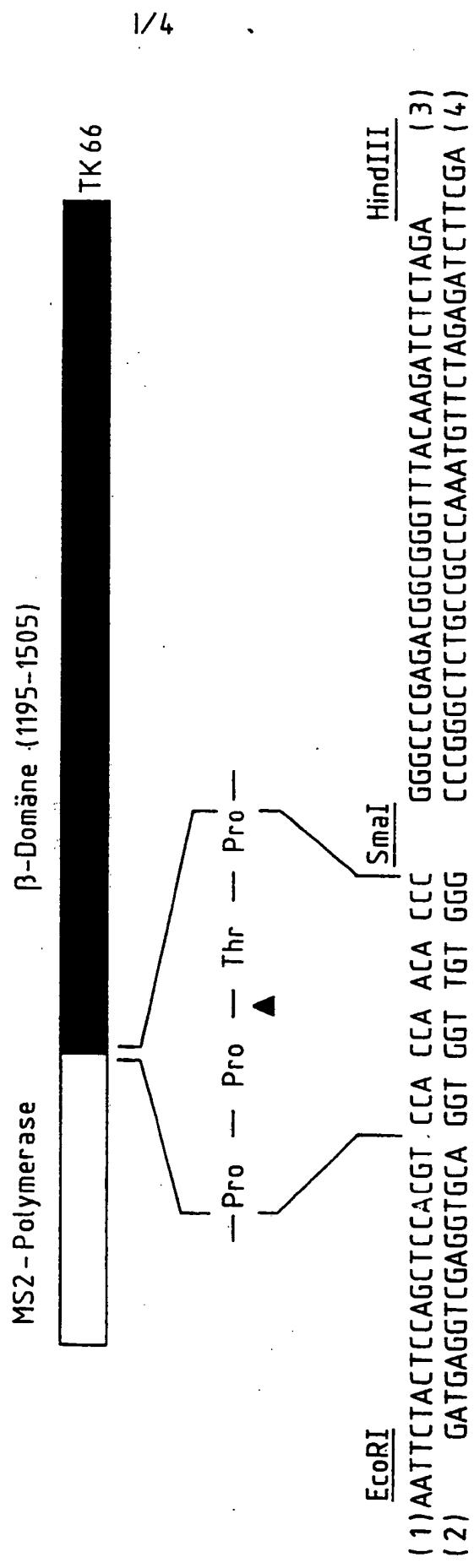


Fig. 2

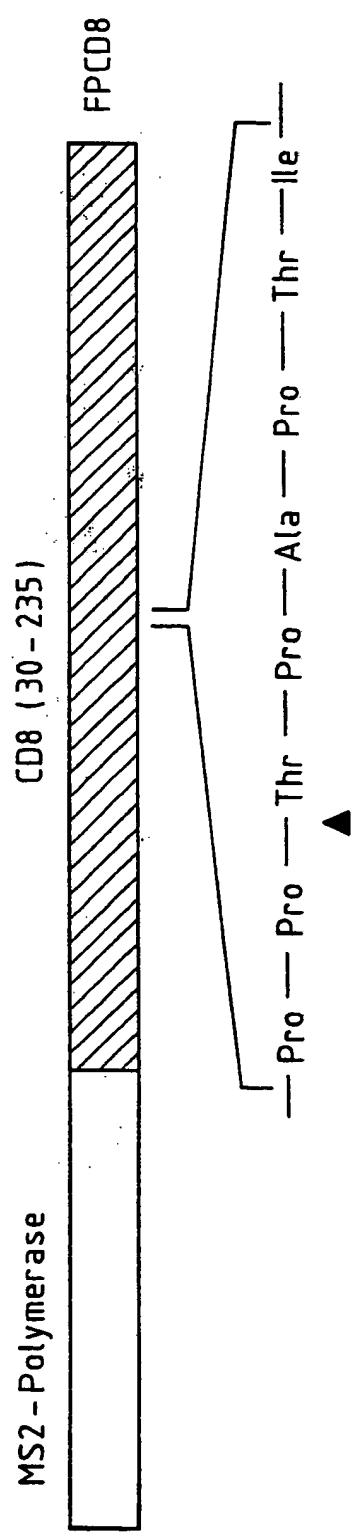


Fig. 3

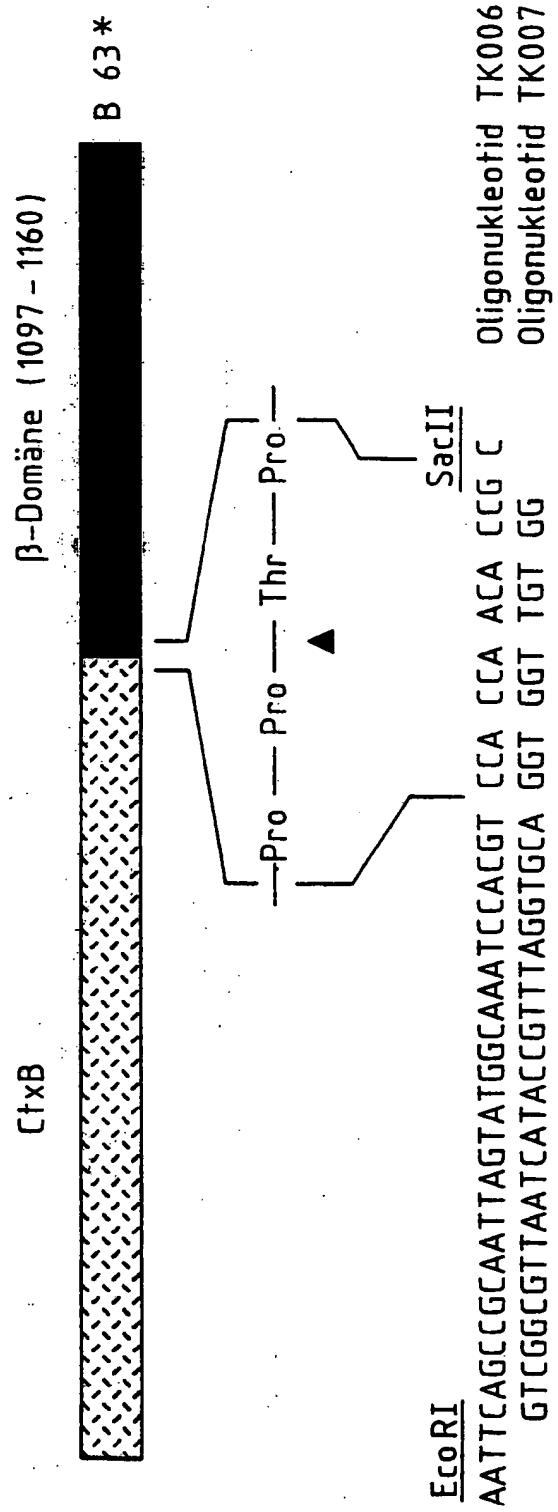
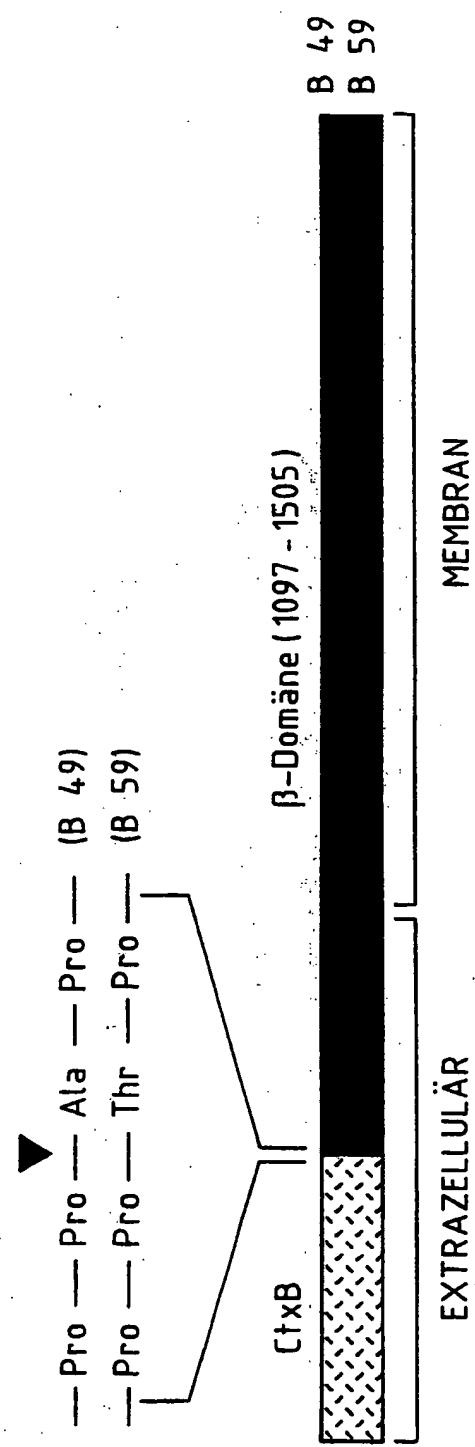


Fig. 4



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 91/00192

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all)

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl. <sup>5</sup> C 12 N 15/62, 15/57, C 07 K 13/00, A 61 K 37/02

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched:

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl. <sup>5</sup>	C 12 N, C 07 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched:

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	Nature, volume 325, 29 January 1987, J. Pohlner et al.: "Gene structure and extracellular secretion of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> IgA protease", pages 458-462 see the whole article	1,2,4,5,11-14,16,17
Y	cited in the application	7-10,18-20, 23-28
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volume 80, May 1983 J. Bricker et al.: "IgA1 proteases of <i>Haemophilus influenzae</i> : cloning and characterization in <i>Escherichia coli</i> K-12", pages 2681-2685 see figure 1 cited in the application	7-10

<sup>10</sup> Special categories of cited documents:

- <sup>"A"</sup> document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- <sup>"E"</sup> earlier document but published on or after the international filing date
- <sup>"L"</sup> document which may throw doubts on priority (claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- <sup>"O"</sup> document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- <sup>"P"</sup> document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- <sup>"T"</sup> later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- <sup>"X"</sup> document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
- <sup>"Y"</sup> document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- <sup>"Z"</sup> document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

3 May 1991 (03.05.91)

Date of Mailing of this International Search Report

26 June 1991 (26.06.91)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	EP, A, 0254090 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFT e.V.) 27 January 1988 see page 4, paragraph 2; pages 5-9, in particular page 6, lines 1-12 & WO, A, 8800238 cited in the application	1,2,4,7-10, 11,12
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, volume 85, December 1988 R.C. Jambou et al.: "High-level expression of bioengineered, cysteine-free hepatocyte- stimulating factor (interleukin 6)-like protein", pages 9426-9430 see the whole article	18-20,23-38
A	Bio/Technology, volume 6, October 1988, T.P. Hopp et al.: "A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification", pages 1204-1210 see the whole article	1-38
P,X	WO, A, 9006370 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA) 14 June 1990 see the whole article	1-13,18-36
		-----

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 9100192  
SA 44022

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 05/06/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A- 0254090	27-01-88	DE-A-	3622221	14-01-88
		WO-A-	8800238	14-01-88
		JP-T-	1500164	26-01-89
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A- 9006370	14-06-90	AU-A-	4801490	26-06-90
		CA-A-	2004261	01-06-90
-----	-----	-----	-----	-----

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Cl 5 C 12 N 15/62, 15/57, C 07 K 13/00, A 61 K 37/02

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff?

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
Int.Cl. 5	C 12 N, C 07 K

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>

III EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup>

Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
X	Nature, Band 325, 29. Januar 1987, J. Pohlner et al.: "Gene structure and extracellular secretion of Neisseria gonorrhoeae IgA protease", Seiten 458-462 siehe den ganzen Artikel	1, 2, 4, 5, 11- 14, 16, 17
Y	in der Anmeldung erwähnt --	7-10, 18-20, 23-28
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Band 80, Mai 1983, J. Bricker et al.: "IgA1 proteases of Haemophilus influenzae: cloning and characterization in Escherichia coli K-12", Seiten 2681-2685 siehe Figur 1 in der Anmeldung erwähnt --	7-10
		./.

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:  
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  
 "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  
 "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  
 "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht  
 "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
3. Mai 1991	26. 06. 91
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevolkächtigten Bediensteten
Europäisches Patentamt	Natalie Weinberg

Art.	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP, A, 0254090 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFT e.V.) 27. Januar 1988 siehe Seite 4, Absatz 2; Seiten 5-9, besonders Seite 6, Zeilen 1-12 & WO, A, 8800238 in der Anmeldung erwähnt --	1,2,4,7-10, 11,12
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Band 85, Dezember 1988, R.C. Jambou et al.: "High-level expression of bioengineered, cysteine-free hepatocyte- stimulating factor (interleukin 6)-like protein", Seiten 9426-9430 siehe den ganzen Artikel --	18-20,23-38
A	Bio/Technology, Band 6, Oktober 1988, T.P. Hopp et al.: "A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification", Seiten 1204-1210 siehe den ganzen Artikel --	1-38
P,X	WO, A, 9006370 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA) 14. Juni 1990 siehe die Ansprüche	1-13,18-36
-----		

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

**EP 9100192  
SA 44022**

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 05/06/91.  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0254090	27-01-88	DE-A-	3622221	14-01-88
		WO-A-	8800238	14-01-88
		JP-T-	1500164	26-01-89
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A- 9006370	14-06-90	AU-A-	4801490	26-06-90
		CA-A-	2004261	01-06-90
-----	-----	-----	-----	-----